

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/CN04/001372

International filing date: 29 November 2004 (29.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: CN  
Number: 200410000697.9  
Filing date: 16 January 2004 (16.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 14 February 2005 (14.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

# 证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2004.01.16

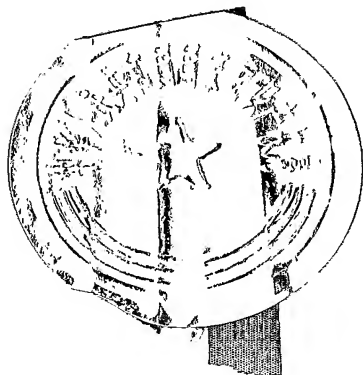
申 请 号： 2004100006979

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 有机介质反应体系中脂肪酶转化油脂生产生物柴油新工艺

申 请 人： 清华大学

发明人或设计人： 杜伟、徐圆圆、刘德华、陈键、曾静、李俐林



中华人民共和国  
国家知识产权局局长

王 荣 川

2004 年 12 月 13 日

1. 一种有机介质反应体系中脂肪酶转化油脂生产生物柴油新工艺, 该工艺是以短链醇 ROH 作为反应酰基受体, 用一些对酶反应活性没有负面影响的相对亲水的有机溶剂作为反应介质, 利用生物酶催化油脂原料进行转酯反应合成生物柴油; 其特征在于: 将醇脂摩尔比为 3: 1~6: 1 的短链醇和油脂、油脂体积 20~200% 的有机溶剂和油脂质量 2~30% 的脂肪酶, 装入具塞三角瓶中或各种酶反应器中混合均匀, 置于可自动控温的往复摇床中或适于酶催化反应的各种生化反应器中进行加热至 20℃~60℃, 反应 5~24 小时后, 油脂原料可完全转化生成生物柴油和副产物甘油。

2. 根据权利要求 1 所述有机介质反应体系中脂肪酶转化油脂生产生物柴油新工艺, 其特征在于: 所述相对亲水的有机溶剂为叔丁醇、1, 4-二氧六环或短链脂肪酸酯 RCOOR', 其中 R 和 R' 为具有 1~4 个碳原子的烷基。

3. 根据权利要求 1 所述有机介质反应体系中脂肪酶转化油脂生产生物柴油新工艺, 其特征在于: 所述脂肪酶为微生物脂肪酶, 包括 Lipozyme TL, Lipozyme RM, Novozym 435 或它们的混合物。

4. 根据权利要求 1 所述有机介质反应体系中脂肪酶转化油脂生产生物柴油新工艺, 其特征在于: 所述油脂为生物油脂包括植物油脂、动物油脂、废食用油或炼油脚料。

5. 根据权利要求 4 所述有机介质反应体系中脂肪酶转化油脂生产生物柴油新工艺, 其特征在于: 所述植物油脂为蓖麻油、菜籽油、大豆油、花生油、玉米油、棉子油、米糠油或藻类油脂。

6. 根据权利要求 4 所述有机介质反应体系中脂肪酶转化油脂生产生物柴油新工艺, 其特征在于: 所述动物油脂为鱼油、猪油。

7. 根据权利要求 1 所述有机介质反应体系中脂肪酶转化油脂生产生物柴油新工艺, 其特征在于: 所述短链醇 ROH 中 R 为具有 1~5 个碳原子的烷基。

8. 根据权利要求 1 所述有机介质反应体系中脂肪酶转化油脂生产生物柴油新工艺, 其特征在于: 所述短链醇为甲醇、乙醇、丙醇、丁醇或戊醇。

## 有机介质反应体系中脂肪酶转化油脂生产生物柴油新工艺

## 技术领域

本发明属于生物油脂合成领域，特别涉及利用有机溶剂作为反应介质的一种有机介质反应体系中脂肪酶转化油脂生产生物柴油新工艺。

## 背景技术

油脂工业的新前景-生物柴油是由生物油脂原料通过转酯反应生成的长链脂肪酸酯类物质，是一种新型的无污染可再生能源，被称为生物柴油。其燃烧性能可以与传统的石油系柴油媲美，由于生物柴油燃烧后发动机排放出的尾气里有害物质比传统石化柴油降低了 50%。目前生物柴油的研究和应用已经受到了广泛的关注。

目前生物柴油主要是用化学法生产，即用动植物油脂和一些低碳醇（甲醇或乙醇）在碱或者酸性催化剂作用下进行转酯反应，生成相应的脂肪酸甲酯或乙酯。化学法制备生物柴油存在如下一些不可避免的缺点：①油脂原料中的游离脂肪酸和水严重影响反应的进行；②甲醇在油脂中溶解性不好，易导致乳化液的形成从而使得后续处理过程复杂；③工艺要求甲醇用量大大超过反应摩尔比，过量甲醇的蒸发回流增大过程能耗。

由于利用生物酶法合成生物柴油具有反应条件温和、无污染物排放、油脂原料中的游离脂肪酸和少量水不影响酶促反应等优点，符合绿色化学的发展方向，因而日益受到人们的重视。

但同化学方法相比，生物酶法也存在如下一些亟待解决的问题。在[Shimada Yuji et al. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 17:133-142]文献中报道：甲醇、乙醇等短链醇在油脂原料中的溶解性较差，不利于反应的进行；其次，过量醇的存在会导致脂肪酶严重失活，故在利用生物酶法生产生物柴油的工艺过程中，多采用分批加入短链醇的方式以

缓解其对酶的毒害作用。这种方式操作繁琐，反应时间较长；另外，以短链醇作为反应的酰基受体，反应过程中有副产物甘油产生，亲水性的甘油容易附着在固定化酶内孔及外表面，从而对酶的活性位点形成“屏蔽”，严重影响酶反应活性；而且，同化学方法相比，酶法合成生物柴油的得率相对较低。为改善以上情况，一些学者尝试采用有机溶剂反应体系合成生物柴油，文献[Shimada Yuji et al. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 17:133-142]报道：采用一些疏水性较强的有机溶剂如己烷、环己烷、石油醚等作为反应介质。这些疏水性有机溶剂可以很好的溶解油脂，在一定程度上能促进反应的进行；但由于这些疏水性较强的有机溶剂并不能有效溶解甲醇等低碳醇以及副产物甘油，故对酶反应活性、酶的使用寿命以及生物柴油得率等并未有明显改善。

### 发明内容

本发明的目的在于提出一种有机介质反应体系中脂肪酶转化油脂生产生物柴油新工艺。该工艺是以短链醇 ROH 作为反应酰基受体，用一些对酶反应活性没有负面影响的相对亲水的有机溶剂作为反应介质，利用生物酶催化油脂原料进行转酯反应合成生物柴油。其特征在于：将醇脂摩尔比为 3: 1~6: 1 的短链醇和油脂、油脂体积 20-200% 的有机溶剂和油脂质量 2~30% 的脂肪酶，装入具塞三角瓶中混合均匀，置于可自动控温的往复摇床中加热至 20℃~60℃，反应 5-24 小时后，油脂原料可完全转化生成生物柴油和副产物甘油。

所述相对亲水的有机溶剂为叔丁醇、1, 4-二氧六环或短链脂肪酸酯 RCOOR'，其中 R 和 R' 为具有 1-4 个碳原子的烷基。

所述脂肪酶为微生物脂肪酶，包括 Lipozyme TL, Lipozyme RM, Novozym 435 或它们的混合物

所述油脂为生物油脂包括植物油脂、动物油脂、废食用油或炼油脚料。

所述植物油脂为蓖麻油、菜籽油、大豆油、花生油、玉米油、棉子油、米糠

7  
油或藻类油脂。

所述动物油脂为鱼油、猪油。

所述短链醇 ROH 中 R 为具有 1-5 个碳原子的烷基。

所述短链醇为甲醇、乙醇、丙醇、丁醇或戊醇。

本发明的有益效果是提高了酶反应活性、延长了酶的使用寿命并显著提高了生物柴油得率。这些新型有机介质反应体系可以促进甲醇等短链醇在油脂中的溶解，有效降低短链醇对酶反应活性的负面影响；其次，在这种有机介质反应体系中，可以一次性加入反应所需低碳醇，从而可显著缩短酶促反应时间、提高生物柴油得率，生物柴油得率达 94% 以上；另外，这些相对亲水的有机溶剂在一定程度上可以部分溶解甘油，可以有效降低反应物低碳醇以及副产物甘油对酶反应活性的负面影响、显著提高酶反应活性，有效改善甘油对固定化酶孔径的“屏蔽”状况，提高酶反应活性并延长酶的使用寿命。

#### 具体实施方式

本发明提出一种有机介质反应体系中脂肪酶转化油脂生产生物柴油新工艺。该工艺是以短链醇 ROH（R 为具有 1-5 个碳原子的烷基）作为反应酰基受体，用一些对酶反应活性没有负面影响的相对亲水的有机溶剂叔丁醇、1,4-二氧六环或短链脂肪酸酯 RCOOR'（R 和 R' 为具有 1-4 个碳原子的烷基）作为反应介质，利用生物酶催化油脂原料进行转酯反应合成生物柴油。其工艺是将醇脂摩尔比为 3:1~6:1 的短链醇和油脂、油脂体积 20-200% 的有机溶剂和油脂质量 2~30% 的脂肪酶，装入具塞三角瓶中或适于酶催化反应的各种生化反应器中混合均匀，置于可自动控温的往复摇床中加热至 20℃~60℃，反应 5-24 小时后，油脂原料可完全转化生成生物柴油和副产物甘油。

所述脂肪酶为微生物脂肪酶，包括 Lipozyme TL, Lipozyme RM, Novozym 435 或它们的混合物

上述油脂为生物油脂包括植物油脂（蓖麻油、菜籽油、大豆油、花生油、玉米油、棉子油、米糠油或藻类油脂）、动物油脂（鱼油、猪油）、废食用油或炼油

脚料。上述短链醇为甲醇、乙醇、丙醇、丁醇或戊醇。

下面通过实施例来进一步说明本发明。

#### 实施例 1

将摩尔比为 4: 1 的甲醇和菜籽油（菜籽油 9.65g）和基于油脂体积 100 % 的叔丁醇，装入具塞三角瓶中混合均匀，并置于可自动控温的往复摇床中加热至 40℃后，加入油脂质量 10% 的固定化脂肪酶 Novozym 435 开始反应，经 6 小时后生产出生物柴油 9.64g，生物柴油得率约为 100%。

#### 实施例 2

将摩尔比为 3: 1 的甲醇和大豆油（大豆油 9.65g）和基于油脂体积 20% 的叔丁醇，装入具塞三角瓶中混合均匀，并置于可自动控温的往复摇床中加热至 20℃后，加入油脂质量 2% 的固定化脂肪酶 Novozym 435 开始反应，经 24 小时后生产出生物柴油 9.17g，生物柴油得率为 95%。

#### 实施例 3

将摩尔比为 5: 1 的乙醇和棉籽油（棉籽油 9.65g）、基于油脂体积 200% 的甲酸甲酯，装入具塞三角瓶中混合均匀，并置于可自动控温的往复摇床中加热至 60℃后，加入基于油脂质量 10% 的固定化脂肪酶 Novozym 435 开始反应，经 12 小时后生产出生物柴油 9.1g，生物柴油得率为 94%。

#### 实施例 4

将摩尔比为 3: 1 的丁醇和废食用油（废食用油 9.65g）、基于油脂体积 80 % 的叔丁醇，装入具塞三角瓶中混合均匀，并置于可自动控温的往复摇床中加热至 40℃后，加入基于油脂质量 10% 的固定化脂肪酶 Novozym 435 开始反应，经 7 小时后生产出生物柴油 9.65g，生物柴油得率为 100%。

#### 实施例 5

将摩尔比为 4: 1 的甲醇和猪油（猪油 9.65g）、基于油脂体积 100 % 的 1,4-二氧六环，装入具塞三角瓶中混合均匀，并置于可自动控温的往复摇床中加热至 50℃后，加入基于油脂质量 20% 的固定化脂肪酶 Novozym 435 开始反应，经 10

小时后生产出生物柴油 9.46g, 生物柴油得率为 98%。

#### 实施例 6

将摩尔比为 3: 1 的甲醇和大豆油 (大豆油 9.65g)、基于油脂体积 50% 的叔丁醇, 装入具塞三角瓶中混合均匀, 并置于可自动控温的往复摇床中加热至 40℃ 后, 加入基于油脂质量 20% 的固定化脂肪酶 Lipozyme TL 开始反应, 经 10 小时后生产出生物柴油 9.1g, 生物柴油得率为 94%。

#### 实施例 7

将摩尔比为 4: 1 的戊醇和菜籽油 (菜籽油 9.65g)、基于油脂体积 100 % 的丁酸丁酯, 装入具塞三角瓶中混合均匀, 并置于可自动控温的往复摇床中加热至 50℃ 后, 加入基于油脂质量 30% 的固定化脂肪酶 Lipozyme TL 开始反应, 经 8 小时后生产出生物柴油 9.17g, 生物柴油得率为 95%。

#### 实施例 8

将摩尔比为 3: 1 的乙醇和棉籽油 (棉籽油 9.65g)、基于油脂体积 80% 的叔丁醇, 装入具塞三角瓶中混合均匀, 并置于可自动控温的往复摇床中加热至 40℃ 后, 加入基于油脂质量 20% 的固定化脂肪酶 Lipozyme RM 开始反应, 经 10 小时后生产出生物柴油 9.1g, 生物柴油得率为 94%。

#### 实施例 9

将摩尔比为 3: 1 的甲醇和鱼油 (鱼油 9.65g)、基于油脂体积 50 % 的 1,4-二氧六环, 装入具塞三角瓶中混合均匀, 并置于可自动控温的往复摇床中加热至 50℃ 后, 加入基于油脂质量 2% 的固定化脂肪酶 Novozym 435 和 10% 的 Lipozyme TL 开始反应, 经 18 小时后生产出生物柴油 9.46g, 生物柴油得率为 98%。

#### 实施例 10

将摩尔比为 4: 1 的乙醇和米糠油 (米糠油 9.65g)、基于油脂体积 150 % 的叔丁醇, 装入具塞三角瓶中混合均匀, 并置于可自动控温的往复摇床中加热至 40℃ 后, 加入基于油脂质量 2% 的固定化脂肪酶 Novozym 435 和 10% 的 Lipozyme RM 开始反应, 经 10 小时后生产出生物柴油 9.36g, 生物柴油得率为 97%。



10

实施例 11:

将实施例 1 中反应后的脂肪酶直接滤出用于下一批次反应, 其他反应条件同实施例 1, 如此将脂肪酶连续回用 10 次。在第 10 个反应批次中, 反应 6 小时可生产出生物柴油 9.62g, 生物柴油得率仍高达 99%。

根据上述实施例, 以叔丁醇、1,4-二氧六环、短链脂肪酸酯  $\text{RCOOR}'$  ( $\text{R}$ 、 $\text{R}'$  为具有 1-4 个碳原子数的烷基) 作为有机介质反应体系, 短链醇  $\text{ROH}$  ( $\text{R}$  为具有 1-5 个碳原子数的烷基) 作为反应酰基受体时, 在适宜的温度范围下加入油脂质量 2%~30% 的固定化脂肪酶 Novozym 435 (来源于 *Candida antarctica*)、Lipozyme RM (来源于 *Rhizomucor miehei*) 或 Lipozyme TL (来源于 *Thermomyces lanuginosus*), 不同生物油脂原料 (蓖麻油、菜籽油、棉籽油、废食用油、大豆油、鱼油、猪油、炼油下脚料、藻类油脂等) 都能被高效转化生成生物柴油。短链醇与油脂最优的反应摩尔比为 3:1~5:1, 最优的有机溶剂添加量为基于油脂体积的 50%-100%, 最优的反应温度为 30℃~50℃。